

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **61104790 A**

(43) Date of publication of application: 23 . 05 . 86

(51) Int. Cl

**C12N 15/00**// **C12P 13/22****(C12N 15/00 , C12R 1:19 , C12R 1:125 )**(21) Application number: **59225915**

(22) Date of filing: 29 . 10 . 84

(71) Applicant: **SHOWA DENKO KK**(72) Inventor: **SAKIMOTO KAZUNORI  
TAKAMATSU HISAO  
TAKINISHI EIKO  
NAKAYAMA AKIRA  
YAJIMA YOSHIHIRO****(54) NOVEL RECOMBINANT DNA HAVING GENETIC  
INFORMATION PARTICIPATING IN  
BIOSYNTHESIS OF L-TRYPTOPHAN**

(57) Abstract:

**PURPOSE:** To provide a recombinant DNA capable of creating a transformed strain capable of producing L-tryptophan in high productivity, and obtained by the recombination of an Escherichia coli plasmid vector which can be expressed even in Bacillus subtilis and an L-tryptophan biosynthesis gene DNA fragment.

**CONSTITUTION:** The phage DNA obtained from the plasmid pTP4 having a chloramphenicol-resistant gene is incised with a restriction enzyme EcoRI (A) to obtain a fragment (B). Separately, a plasmid pBR322 DNA is

incised with the component A to obtain a fragment (C). The fragments B and C are mixed together at an equal concentration of the terminal groups of the fragment, and linked by using T4 phage ligase. A CaCl<sub>2</sub>-treated Escherichia coli is transformed with the DNA prepared by the above process. The plasmid pSD3165 is separated and purified from the bacterial cell, and is incised with the component A to obtain a fragment (D). Separately, a phage  $\phi$ 105 DNA containing tryptophan operon originated from Bacillus subtilis is incised with the component A to obtain a fragment (E). The fragments D and E are mixed together, and linked with T4 phage ligase.

COPYRIGHT: (C)1986,JPO&amp;Japio

⑩ 日本国特許庁 (J P)  
⑫ 公開特許公報 (A)

⑪ 特許出願公開

昭61-104790

⑬ Int. Cl.<sup>4</sup>  
C 12 N 15/00

識別記号 庁内整理番号  
7115-4B※

⑭ 公開 昭和61年(1986)5月23日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全7頁)

⑯ 発明の名称 L-トリプトファンの生合成に關与する遺伝情報を有する新規組換え体DNA

⑰ 特 願 昭59-225915  
⑱ 出 願 昭59(1984)10月29日

⑲ 発 明 者 崎 元 和 範 東京都大田区多摩川2丁目24番25号 昭和電工株式会社生化学研究所内  
⑲ 発 明 者 高 松 久 雄 東京都大田区多摩川2丁目24番25号 昭和電工株式会社生化学研究所内  
⑲ 発 明 者 滝 西 英 光 東京都大田区多摩川2丁目24番25号 昭和電工株式会社生化学研究所内  
⑳ 出 願 人 昭和電工株式会社 東京都港区芝大門1丁目13番9号  
㉑ 代 理 人 弁理士 菊地 精一

最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

L-トリプトファンの生合成に關与する遺伝情報を有する新規組換え体DNA

2. 特許請求の範囲

枯草菌内でも発現し得るクロラムフェニコール耐性遺伝子を有する大腸菌プラスミドベクター pSD3165。

2. L-トリプトファンの生合成に關与する遺伝情報を有するDNA断片と、大腸菌プラスミド pBR325又は大腸菌プラスミド pSD3165との組換え体DNA pSD2961又は pSDT1111。

3. 発明の詳細な説明

(技術分野)

本発明はバチルス属から選ばれた菌を宿主細胞として形質転換を行なわせしめる組換え体DNAとして有用な新規大腸菌組換えプラスミドに關し、更に詳しくは、バチルス属に屬する宿主菌に、トリプトファンの生合成に關与する遺伝子を含むDNA断片とベクターDNAとの組換え体DNAを用い

該宿主菌内で自己複製させることなく、つまり宿主菌の染色体内に該組換え体DNAを安定に挿入せしめて、L-トリプトファンの高生産性形質転換菌を創製出来る新規組換え体DNAに關する。  
(従来技術)

発酵法によるL-トリプトファンの製造はその経済性の観点から注目を集め、その際特に、その基礎となるL-トリプトファン生産菌の改良は重要な課題となっている。

従来、菌の改良には公知の方法、例えば特開昭59-130181号公報に見られるように、主に人工突然変異法が用いられ、取得した突然変異株によってL-トリプトファンの製造が行なわれて来た。しかし、L-トリプトファンの収量は商業的に必ずしも充分なものとは言えず、その経済的製法の追求が望まれている。そこで、最近開発された遺伝子組換え技術を利用してアミノ酸を高度に生産するように微生物を処理することが出来るように種々の研究が行われている。

ところで、遺伝子組換え技術による菌の改良は、

先ず遺伝子をその供与細胞から取出し、試験管内でベクター DNA と結合させ、得られた組換え体 DNA を宿主細胞に取り込ませる。そして、目的とする組換え体 DNA を有する宿主細胞を増殖せしめ、次いで導入遺伝子を発現せしめることによって目的の産物を得る。しかし、これら従来の一般的な方法によって用いられて来た組換え体 DNA は宿主細胞内で一般に不安定で培養中に消失したり、あるいは、組換え体の一部が欠失を生ずることがある。それゆえ、宿主細胞内における組換え体 DNA の安定化手法が確立されない限り実用性に制約を受ける。そこで、本発明者等は宿主菌内で自己複製能力を有さない組換え体 DNA を宿主細胞の染色体に挿入（インテグレーション）することが出来れば、安定に組換え体 DNA が宿主細胞に保持され、上記制約から逃れられることが期待されたと考えた。しかしながら、宿主菌内で自己複製能力を有さない組換え体 DNA を宿主菌の染色体に挿入せしめ、得られる形質転換菌を用いて、L-トリプトファンなどの製造のために供したという例はない。

え体 DNA を用いてトリプトファンアナログ耐性を有する宿主菌を形質転換させた所、親株と比較して、例えばトリプトファン生合成に関係する酵素活性が高くなった菌株を選択することが出来る。

このように選択された形質転換菌は、L-トリプトファンの生産性が高く、更に、例えば一般に知られている自己複製能のある組換え体 DNA、例えば、プラスミドやファージを用いた場合のような特別な配慮やその不安定さに伴う障害を克服するための対策を講ずることなしに培養が可能であるなど、工業的に有利に L-トリプトファンの製造に供することができる。

本発明によれば、L-トリプトファンの生合成に関与する遺伝子（望ましくは、トリプトファンあるいはトリプトファンアナログなどによる阻害が解除されているものが望ましい。）を有する DNA 断片とベクター DNA との、宿主菌内で自己複製能力のないが染色体に安定に挿入される組換え体 DNA が取得出来、これを用いることによってパナルス菌に属する微生物から選ばれる宿主菌株（好

従来、宿主菌内で自己複製能力を有さない組換え体 DNA の研究としては、わずかに、パナルス菌に属する微生物において遺伝子地図作成や遺伝子解析のために、染色体 DNA 断片を有する組換え体プラスミドを用いてパナルス菌の染色体に組換え体プラスミドを挿入せしめ、孢子形成に関与する遺伝子座の同定を行ったり、組換え体プラスミドの染色体への挿入の機構研究などの基礎研究があるにとどまっている〔参考、J. Bacteriol. 142、90-98 (1980) 及び Proc. Natl. Acad. Sci. USA、75、3664-3668 (1978)〕。

#### （発明の目的及び構成）

そこで、L-トリプトファンの発酵法による製造のために、L-トリプトファンの生合成に関与する遺伝子を新たに宿主菌の染色体に挿入させるべく鋭意研究を行った所、L-トリプトファンの生合成に関与する遺伝子を有する染色体断片と、ベクター DNA を試験管内で結合せしめ、宿主菌内で自己複製能力を有さないが染色体に挿入できる組換え体 DNA を取得することに成功した。該組換

ましくは、トリプトファンアナログ耐性を有する宿主菌）を形質転換出来る。形質転換菌にはその染色体に該組換え体 DNA が新たに挿入されており、こうして、L-トリプトファンの生合成を調整する遺伝子が新たに付加された染色体 DNA を有する L-トリプトファン高生産性菌が提供でき、さらに該形質転換菌を用いた L-トリプトファンの経済的な発酵法による製造法が提供される。

以下、本発明について更に説明する。

#### 組換え体 DNA の作製

従来、宿主菌を形質転換せしめる場合には、もっぱら宿主菌内で自己複製能力を有する組換え体 DNA、例えば、プラスミドやファージが用いられて来た。しかし、本発明では、染色体に安定に組換え体 DNA を挿入せしめるために、自己複製能力を有さない組換え体 DNA を使用した。

本発明に於ける L-トリプトファンの生合成に関与する遺伝情報を有する DNA 断片は、通常 L-トリプトファン生産能を有する微生物の染色体 DNA より適当な制限酵素によって切出されたもの

が用いられるが、宿主菌の染色体 DNA との相同性が高いものであれば原則としてその由来については特別な制限はなく、例えば、土壌や他の天然物から分離される レトリプトファン 生産能を有する野生株は勿論のこと、それらを紫外線照射や化学物質による処理をして得られる人工的突然変異株或いは遺伝子組換え技術を用いて得られる レトリプトファンの生合成に關与する遺伝情報を含む組換え DNA 等いずれでも良い。尚、この場合、該 DNA 断片は レトリプトファンの生合成に關与する遺伝情報を有する部分のみ からなり、他に余分な部分を含まないものであることが望ましいが、用いる制限酵素の種類によってはその前後に若干他の部分を含むことがあり、そのようなものであっても宿主菌との相同性や目的とする レトリプトファンの生合成に悪影響を及ぼさない限り 用いることができる。また、該 DNA 断片は レトリプトファンの生合成に關与する遺伝情報のすべてを有する必要はなく、その一部分のみを含んでいる DNA でも用いることができる。

pACYC184, pBR322, pAT153, MUA-3, pCR1, pKT287, pKN402, pBR325, pBR328, pBR327, pNO1523, pKB111, pKK223-3, pKC30 などの大腸菌由来のプラスミド及びその誘導体があげられるが、所謂宿主-ベクター系として成り立つものであれば、腸菌系にこだわる必要はない。特に、本発明のすぐれた点は、例えばバチルス属に属さない宿主細胞、例えば大腸菌などでクローニング出来れば、その系で用いた組換え体 DNA そのものを直接本発明に使用出来る点にある。その際、従来技術であれば、宿主菌以外でクローニングした時、ベクターとして宿主菌内でも自己複製可能なベクター（例えば宿主菌内で複製可能なシャトルベクターとか広宿主領域ベクターなど）を使用しておくか、あるいはクローニングした DNA を宿主菌内で安定に存在し得るベクターと連結させ直す操作などの配慮を必要とした。

以下に代表的な例として大腸菌由来のプラスミド pBR322 及び pBR325 を使用した例を示し、更に具体的に詳述するが、前述の如く他の例について

このような レトリプトファンの生合成に關与する遺伝情報を有する染色体 DNA を有する微生物 としては、例えば、バチルス・アミロリジ、ファジエンス、バチルス・アミロリチカス、バチルス・アルカロフィラス、バチルス・コアエララン、バチルス・ライケニホルミス、バチルス・ナットウ、バチルス・ズブチルス、バチルス・ステアロサーモフィラス等のバチルス属に属する微生物や、それらの変異株など、およびそれらを親株として遺伝子組み換えによって育種した株等が掲げられる。

また、これら DNA よりトリプトファン生合成に關与する遺伝子を切出すのに用いられる制限酵素としては特に制限はないが、トリプトファンの生合成に關与する遺伝子中にも切断部位が少ない様子が望ましく、例えば、EcoRI, BamHI, SalI, SacI, PvuII, XhoI, XbaI, MboI, MluI 等があげられる。

本発明において、宿主菌内で自己複製しないベクターとしては、例えば、ColEI, pSC101, pJB8

も同様に行い得ることは言うまでもない。

プラスミド pTP4 の有するクロラムフェニコール耐性遺伝子を常法によりファージ p11 の DNA にクローニングし、次いで該ファージ DNA を制限酵素 EcoRI で切断して、予め EcoRI で切断しておいたプラスミド pBR322 DNA と、それら生じた DNA 断片の末端の数が同じになるような濃度で混合し、T4 ファージリガーゼを用いて結合反応を起こさせる。この DNA を用い、塩化カルシウム処置した大腸菌 C600 trp<sup>-</sup>, leu<sup>-</sup>, thr<sup>-</sup>, rk<sup>-</sup> mk<sup>-</sup> 株を常法により形質転換し、クロラムフェニコール、アンピシリン、テトラサイクリンのいずれにも耐性を有する株を取得した。これら形質転換株からプラスミドを分離精製し、制限酵素地図をつけた所、第1図のような制限酵素地図を有するプラスミドを含む形質転換大腸菌 SD-1007（農工研菌第7860号）が得られた。

該形質転換菌のプラスミド（pSD3165 と称する）には pBR322 の EcoRI の切断点に約 2.5 ノグデルトンのクロラムフェニコール耐性遺伝子が挿入され

ていた。尚、pTP4由来のクロラムフェニコール耐性遺伝子はバチルス・ズブテリス、バチルス・アミロリクティファシエンスなどで発現可能であり、さらに上記の如くクローニングした該クロラムフェニコール耐性遺伝子に関してもバチルス・ズブテリス及びバチルス・アミロリクティファシエンスなどのバチルス属に属する菌内で発現することは後に記述するように明らかである。

次にpSD3165を制限酵素(EcoRI)で部分的に切断し、またクローンしたトリプトファンアナログ耐性枯草菌由来のトリプトファンオペロンを含むファージφ105 DNA(特開昭59-125892号参照)も制限酵素(EcoRI)で切断し、両者DNAを混合し、T4ファージリガーゼを用いて結合させる。このDNAを用い、塩化カルシウム処理した大腸菌C600 trp<sup>-</sup>、leu<sup>-</sup>、thr<sup>-</sup>、rk<sup>-</sup>、mk<sup>-</sup>株を常法により形質転換し、クロラムフェニコール耐性、アンピシリン耐性及びネトラサイクリン耐性でかつTrp非要求性を示す形質転換菌を取得する。

該形質転換菌から組換えプラスミドを常法によ

り、報告を含むファージφ105 DNAもEcoRIにて切断し、両者のDNAを適当な濃度で混合し、両DNA断片をT4ファージリガーゼで結合させる。次に、このDNAを用い、大腸菌C600 trp<sup>-</sup>、leu<sup>-</sup>、thr<sup>-</sup>、rk<sup>-</sup>、mk<sup>-</sup>株を上述の方法で形質転換せしめた。

そして、アンピシリン耐性、ネトラサイクリン耐性かつクロラムフェニコール耐性でなかつTrp非要求性の形質転換菌大腸菌SD-1009(發工研菌寄第7862号)を選択した。該菌よりプラスミドを常法により分離精製した所、第3図に示すようなプラスミド(pSD2961)が得られた。

尚、該プラスミドを用いて、バチルス・ズブテリス his B株を形質転換した所、His非要求性株が得られることから、該組換え体DNAはトリプトファンオペロン以外にhis B遺伝子も含むことが判る。

以下に本発明によって得られた組換え体DNAを用いて、L-トリプトファンの高生産性を示す形質転換菌取得の代表的な実施例を示すが、本発明の範囲をこれら実施例に限定するものでないこと

り分離精製し、制限酵素地図を作製した所、第2図のように制限酵素地図を持つプラスミドを有する形質転換菌大腸菌SD-1008(發工研菌寄第7861号)が得られた。この形質転換菌のプラスミド(pSDT1111と称する)にはpSD3165のEcoRI切断点の1つに約5メガダルトンのDNAが挿入されていた。この挿入DNAは、各種トリプトファン要求株(trpA<sup>-</sup>、trpB<sup>-</sup>、trpC<sup>-</sup>、trpD<sup>-</sup>またはtrpE<sup>-</sup>等の突然変異株)を受容菌としてpSDT1111を供与体DNAとした時、全てにTrp非要求性の形質転換菌が高頻度に出現せしめることから、トリプトファンの生合成を調整する遺伝情報を有すると考えられる。

次いでpBR325を用いた例を示す。

プラスミドpBR325を制限酵素(例えば、EcoRI)で切断し、また例えば、特開昭59-125892号で示された方法でクローンしたバチルス・アミロリクティファシエンスIAM1521(東京大学応用微生物研究所より入手)の5-フルオロトリプトファン耐性株のトリプトファンの生合成を調整する遺伝情

はいうまでもない。

宿主菌としては前述したような組換え体DNAをその染色体内に挿入し得るものならばいずれでもよい。ここでは、代表的な例としてバチルス・ズブテリス IMA1026株(東京大学応用微生物研究所より入手)ならびにバチルス・アミロリクティファシエンス IMA1521株とそのトリプトファンアナログ耐性株、バチルス SD-30(特開昭59-130181号)を宿主菌として例示する。

但し、バチルス SD-30 以外はトリプトファン・アナログである5-フルオロトリプトファン(以下、5-FTと略す)感受性であったので、例えば、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン等を用いて常法により人工突然変異処理をして、5-FT耐性菌を取得して、以下の実験に供した。また、IMA1521株に関しては、同様の突然変異処理で5-FT耐性を有すヒスチジン要求株を取得し、実験に供した。

実施例1

pSDT1111 0.1~1 μgを上記宿主菌に公知の方法

(例えば J. Bacteriol., 81, 741(1961) 又は Molec. gen. Gent., 168, 111(1979) など) によって取り込ませ、形質転換を行ったところ、クロラムフェニコール (10 µg/ml) を含む寒天培地で成育する、いわゆるクロラムフェニコール耐性を有する形質転換菌パナルス SD-1002 (發工研菌第 7855 号) が取得できた。この菌の菌学的性質は原株パナルス・アミロリクティファシエンシ IMA1521 株とクロラムフェニコール耐性、アントラニル酸による L-トリプトファンの合成阻害、トリプトファンアナログ耐性及びトリプトファン合成系酵素の活性の点で相違する以外は原株と実質的に同じである。

ところで、トリプトファン合成を調整する遺伝子 (含まない、つまり染色体 DNA と相同性がある DNA を含まない pSD3165) のものを用いた時には、クロラムフェニコール耐性菌の出現は認められなく主菌内で自己複製能力はないと考えられた。さらに、上記形質転換菌からは閉環状 DNA (プラスミド) の存在は認められなかった。このことから、

菌 株	L-トリプトファン蓄積 (µg/ml)
パナルス SD-30	3.4
パナルス SD-1002	7.2

以上より、pSD1111 が宿主菌染色体に挿入された結果 pSD1111 由来のトリプトファン生合成系遺伝子が新たに染色体上に付加されトリプトファン生合成系遺伝子が増幅されたと解釈できる。

#### 実施例 2

宿主菌として IMA1026 株の 5-FU 耐性株を用いた場合も、同様にして pSD1111 DNA によって、クロラムフェニコール耐性を有し、L-トリプトファンシンセターゼ活性ならびにその蓄積が約 2 倍亢進した形質転換株が取得できた。

#### 実施例 3

IMA1521 の 5-FU 耐性を有するヒスタジソン要求株を宿主菌として、pSD2961 を供与体 DNA として上述の方法により形質転換し、ヒスタジソン非要求性菌を選択する。

この場合には宿主菌のヒスタジソン遺伝子と

pSD1111 が宿主菌染色体に挿入されたと考えられる (参照 Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 75, 3664(1978))。

次に、パナルス SD-30 株を宿主菌に用いて選抜した該形質転換菌の L-トリプトファンシンセターゼの活性の測定 (文献 Methods in Enzymology, 5, 794(1962)) 結果を示す。

菌 株	L-トリプトファンシンセターゼ比活性
パナルス SD-30	100
パナルス SD-1002	203

また、該形質転換株のアントラニル酸 (80 ppm) 存在下におけるスピザイセン最少培地

( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.2%,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.4%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.6%, クエン酸ナトリウム  $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.1%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.02%, グルコース 0.5%) で 37°C、1.5 時間培養した時の L-トリプトファンの蓄積結果を示す。

pSD2961 が有するヒスタジソン遺伝子とが組換えを起こしてヒスタジソン非要求性となった形質転換菌又は上述したように pSD2961 が染色体に挿入された結果ヒスタジソン非要求性となった形質転換菌あるいは両反応が同時に起こったヒスタジソン非要求性形質転換菌の存在が考えられる。

しかし、もし染色体に pSD2961 が挿入された場合にはトリプトファンの合成を調整する遺伝子は染色体上に少なくとも 2 個存在することになり、例えばトリプトファンシンセターゼ活性が宿主菌より高い事が期待される。

実際、測定は少ないが L-トリプトファンシンセターゼ活性の高い形質転換菌パナルス SD-1005 (發工研菌第 7858 号、この菌の菌学的性質は原株パナルス・アミロリクティファシエンシ IMA1521 株とアントラニル酸による L-トリプトファンの合成阻害、5-FU 耐性及びトリプトファン合成系酵素の活性の点で相違する以外は原株と実質的に同じである。) が以下に示すように選抜できた。

図

L-トリプトファン  
シンセターゼ比活性

IAM1521 5FT	
耐性ヒスチジン要求株	100
パチルス SD-1005	178

以上例示したように、抗生物質耐性遺伝子を有した組換え体 DNA を用いたり、L-トリプトファンの生合成に直接関与する遺伝情報以外に他の遺伝子を含む組換え体 DNA を用いたり、栄養要求性変異株を宿主菌として用いたが、これらは染色体に挿入した組換え体 DNA を含む形質転換菌の取得を容易にさせるもので、単に例示に過ぎない。

抗生物質耐性遺伝子であれば、上記理由から宿主細胞内で発現しうるものならいずれてもよく、 $\Delta$ 、宿主菌の突然変異も挿入される DNA と相同性を持つ選択可能な遺伝子変異ならいずれてもよいことは明白である。

#### 4. 図面の簡単な説明

第1図は pSD3165 の制限酵素地図、

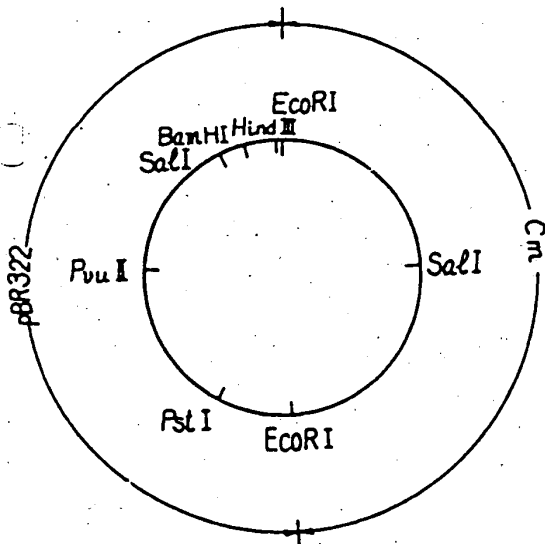
第2図は pSDT1111 の制限酵素地図、

第3図は pSD2961 の制限酵素地図、  
をそれぞれ示す。

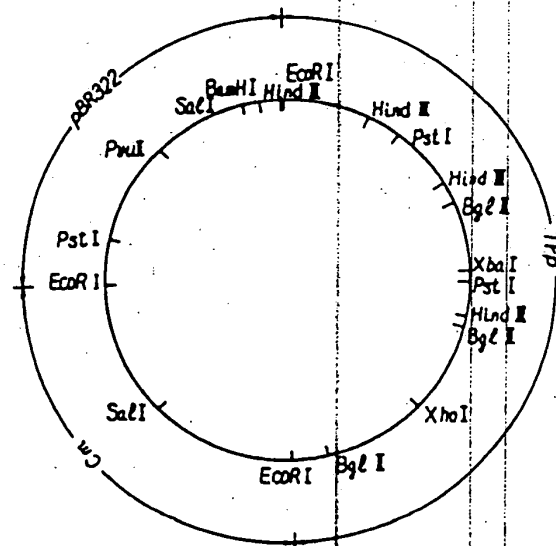
pBR322、pBR325 は大腸菌由来プラスミド、Cm はクロラムフェニコール耐性形質を示す領域、Trp はトリプトファンの生成を調整する領域、Sal I、EcoR I、Hind III、Hinc II、BamH I、Pst I、Pvu II、Xba I、Bgl II、Xho I、は制限酵素名であり、各酵素による切断部位を示す。

特許出願人 昭和電工株式会社

第1図

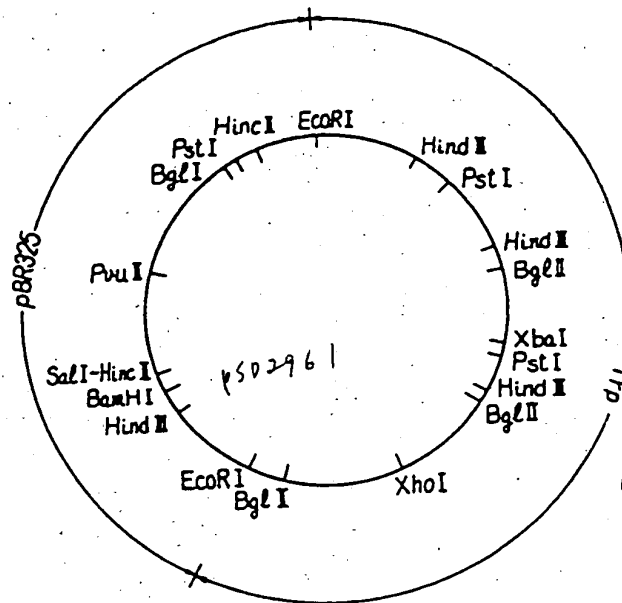


第2図



Try analogue 5' Hpa  
Try operon 5' Hpa

## 第3図



第1頁の続き

⑤Int. Cl. 4

識別記号

庁内整理番号

// C 12 P 13/22  
(C 12 N 15/00  
C 12 R 1:19  
1:125)

A-8213-4B

⑦発明者 中山 明 東京都大田区多摩川2丁目24番25号 昭和電工株式会社生化学研究所内  
⑦発明者 矢島 善博 東京都大田区多摩川2丁目24番25号 昭和電工株式会社生化学研究所内